温敏性品种雌雄蚁蚕蛋白质双向电泳图谱差异分析

徐秋云，林健荣*，毛立明，孔庆明，钟杨生，王叶元，林碧敏
（华南农业大学动物科学学院蚕丝科学系，广州 510642）

摘要：为探讨温敏性品种限伴雌雄蚁体蛋白组分的差异，对刚孵出的雌（黑色）、雄（赤色）蚁体蛋白用双向电泳的技术和方法进行蛋白组分的比较分析。结果显示：在易溶蛋白中，雄蚁和雌蚁分别检测到269和250个蛋白点，能相互匹配的蛋白点占86.71%，特异蛋白雄蚁有43个，雌蚁有25个。在难溶蛋白中，雄蚁和雌蚁分别检测到370和427个蛋白点，能互相匹配的占80.10%，雄、雌蚁的特异蛋白分别为52个和106个。结果表明雌雄蚁体的蛋白组成存在差异。

关键词：家蚕；蚁体；蛋白组分；双向电泳；差异分析
中图分类号：S882.6　　**文献标识码**：A　　**文章编号**：0454-6296(2009)03-0327-12

Differential analysis of two-dimensional gel electrophoresis profiles for the newly-hatched male and female larvae of a temperature-sensitive silkworm (*Bombyx mori*) variety

XU Qiu-Yun, LIN Jian-Rong*, MAO Li-Ming, KONG Qing-Ming, ZHONG Yang-Sheng, WANG Ye-Yuan, LIN Bi-Min (Department of Silkworm Science, College of Animal Science, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China)

Abstract: To investigate the differential expression of protein components in the newly-hatched male and female larvae of a temperature-sensitive silkworm variety, Xianban, we compared the protein components of the newly-hatched female (black) and male (red) larvae by using two-dimensional electrophoresis technology. The results showed that 269 and 250 protein spots were detected in easily dissolvable proteins from the newly-hatched male and female larvae respectively. Comparison analysis showed that 86.71% of the total protein spots were matched between male and female larvae, and 43 and 25 specific proteins were found in male and female larvae respectively. In uneasily dissolvable proteins from the newly-hatched male and female larvae, 370 and 424 protein spots were detected respectively. Comparison analysis showed that 80.10% of the total protein spots were matched between the two groups, and 52 and 106 specific proteins were found in male and female larvae respectively. The results indicated that the protein components of the newly-hatched larvae of the silkworm variety are different between the male and female.

Key words: Silkworm; newly-hatched larva; protein components; two-dimensional electrophoresis; differential analysis

雌雄蚕在经济性状和生理特性中存在差异一直受到生物学家的关注。夏建国和唐文月(1980)的研究认为，雄蚕比雌蚕抗高温多湿的能力强，茧丝长和解舒丝长长。项美华等(1982)的实验表明，雄蚕的叶丝转化率比雌蚕高5% ~9%。若单养雄蚕，出丝率能提高10% ~15%(黄君霆，1980)。为此，

基金项目：国家自然科学基金项目(30771634)；广东省科技计划项目(2007B020706005)
作者简介：徐秋云，女，1981年11月生，江苏如东人，硕士，研究方向为昆虫分子生物学，Tel.: 020-39334913; E-mail: qiuyunxu2005@yahoo.cn
*通讯作者 Author for correspondence, Tel.: 020-85280591; E-mail: jrlin@scau.edu.cn
收稿日期 Received: 2008-09-01; 接受日期 Accepted: 2008-12-30

蚕业科学工作者一直在致力于差异及专养雄蚕的研究。潘庆中等(1992)首次利用温敏性的 sch 品种与正常品种杂交，F_1 代利用雌雄的温敏性差异来控制单一的雄蚕孵化。姚耀涛等(2007)利用雌蚕无性克隆系与平衡致死系雄蚕进行杂交，成功组配成多对能专养雄蚕的组合。林健荣等(1997，1999)研究了雌雄温敏性的遗传差异及雌性的温敏致死期。林健荣等(2001)，李金玉等(2003)则从呼吸代谢、酶活性的角度探讨了雌性温敏性表达时的差异变化。但温敏性品种在蚁蚕期的雌雄生理差异则没有见到报道。为此，本文以限伴品种的蚕卵为材料，在胚胎期用常温常湿条件保护催青，对刚孵出的蚁体进行蛋白质组分分析，从蛋白质组学的角度比较雌雄的差异，为今后更好地利用雌雄温敏性的差异来控制单一性别蚕的孵化提供更多的实验依据。

1 材料与方法

1.1 试虫

供试蚕品种为温敏性限伴品种，由华南农业大学动物科学学院蚕丝科学系蚕种课题组提供。该品种为蚁色限性，雌蚕的性染色体基因型为 $Z^{sch}W^{\frown +sch}$，表现为黑蚁；雄蚕的性染色体基因型为 $Z^{sch}Z^{sch}$，表现为赤蚁。

1.2 蚁蚕蛋白样品的制备

取限伴即时浸酸的蚕卵，25 ± 1℃，RH 75% ~ 80% 人工气候培养箱中催青，直至孵化，取刚刚孵出的蚁蚕，分雌雄取样(雌蚕为黑蚁；雄蚕为赤蚁)，-40℃冰箱保存备用。

蛋白的提取参照钟伯雄等(2003)的方法并略加改进。取0.1 g 蚁蚕，置于研钵中，加入 1.5 mL 的磷酸抽提缓冲液(pH 7.5)，冰浴研磨 5 min，130 W 功率的超声波处理 1 min，4℃、10 000 rpm(Eppendorf centrifuge 5804 R)，离心 15 min，取上清液，沉淀保存。上清液经 4℃、10 000 rpm 离心 15 min，再取上清并加入 100% 的 TCA 溶液，使最终浓度达到 10%。冰浴静置 15 min，4℃、10 000 rpm，离心 15 min，弃上清。预冷的丙酮清洗沉淀两次，冷冻干燥去除残留的丙酮，再加入 0.6 mL 样品裂解液(8 mol/L 尿素，2 mol/L 硫脲，2% CHAPS，20 mmol/L Tris，30 mmol/L DTT，1% pH 3 ~ 10 的 IPG 缓冲液)溶解沉淀，4℃、10 000 rpm，离心 15 min，收集上清，作为易溶性蛋白样品，小管分装，-40℃冰箱保存备用。

保存的沉淀加入 0.2 mL 上述样品裂解液，彻底搅拌溶解，130 W 功率的超声波处理 1 min，4℃、10 000 rpm 离心 10 min，收集上清，沉淀中再加 0.2 mL样品裂解液洗涤一次，合并上清。上清中加入 4 倍体积的 TCA 丙酮混和液，置于 -20℃ 冰箱 90 min，而后 4℃、10 000 rpm，离心 15 min，再用预冷的丙酮洗涤两次，冷冻干燥去除残留的丙酮，再加入0.4 mL样品裂解液溶解沉淀，4℃、10 000 rpm，离心 15 min，收集上清，作为难溶性蛋白样品，小管分装，-40℃冰箱保存备用。

1.3 蛋白质的双向电泳分析

电泳上样 100 μg 蛋白，第一向等电聚焦使用 IPGphor 等电聚焦仪，18 cm pH 3 ~ 10 的干胶条，操作按仪器说明书进行，第二向 SDS-PAGE 采用 12.5% 的分离胶，敏感型质谱兼容银染法染色。利用 Amersham Pharmacia 公司生产的 Image scanner 双向电泳凝胶专用透射扫描仪高精度扫描凝胶。采用 2-DE 图像分析软件 Image Master™ 2D Platinum 5.0 进行分析，按说明书操作。

1.4 质谱分析

1.4.1 目标蛋白点的切取：用剪刀将 200 μL Eppendorf 吸头尖端剪掉约 1 cm，孔的直径根据蛋白点的大小确定。用修剪后的吸头在凝胶上垂直戳取蛋白点，再转入 1.5 mL 的离心管中。

1.4.2 LC-TOF-TOF 质谱：蛋白点质谱分析送上海生科院蛋白质组研究分析中心完成，采用 LC-TOF-TOF 对差异蛋白斑点进行质谱分析，具体方法步骤如下：胶内酶解(Trypsin，20 h)→抽提酶解肽段→Zip Tip 脱盐→ ESI 质谱→软件分析数据→鉴定蛋白质。

主要参数为：检测仪器型号：LTQ；进样方式：Microspray；毛细管温度：170℃；Column：0.15 mm ×150 mm (RP-C18)；仪器公司：Thermo Finnigan，San Jose，CA；检测方式：正离子；Trap 柱：Zorbax 300SB-C18 peptide traps (Agilent Technologies，Wilmington，DE)。

(1)毛细管高效液相色谱方法：

A 液为 0.1% 甲酸的水溶液，B 液为 0.1% 甲酸的乙腈水溶液(乙腈为 84%)。色谱柱用 95% 的 A 液平衡后，样品由自动进样器上样到 Trap 柱。

0 ~ 50 min，B 液线性梯度从 4% 到 50%；50 ~ 54 min，B 液线性梯度从 50% 到 100%；54 ~ 60 min，B 液维持在 100%。

(2)质谱数据采集：

多肽和多肽的碎片的质量电荷比按照下列方法

采集:每次全扫描(full scan)后采集 10 个碎片图谱(MS2 scan)。

1.4.3 数据分析:原始文件(raw file)用 BIOWORKERS 软件搜索相应的数据库。最后得到鉴定的蛋白质结果。

2 结果与分析

2.1 易溶性蛋白的双向电泳分析

提取刚孵出还没有进食的蚁蚕体易溶蛋白作双向电泳分析,得到的电泳图谱如图 1 所示。

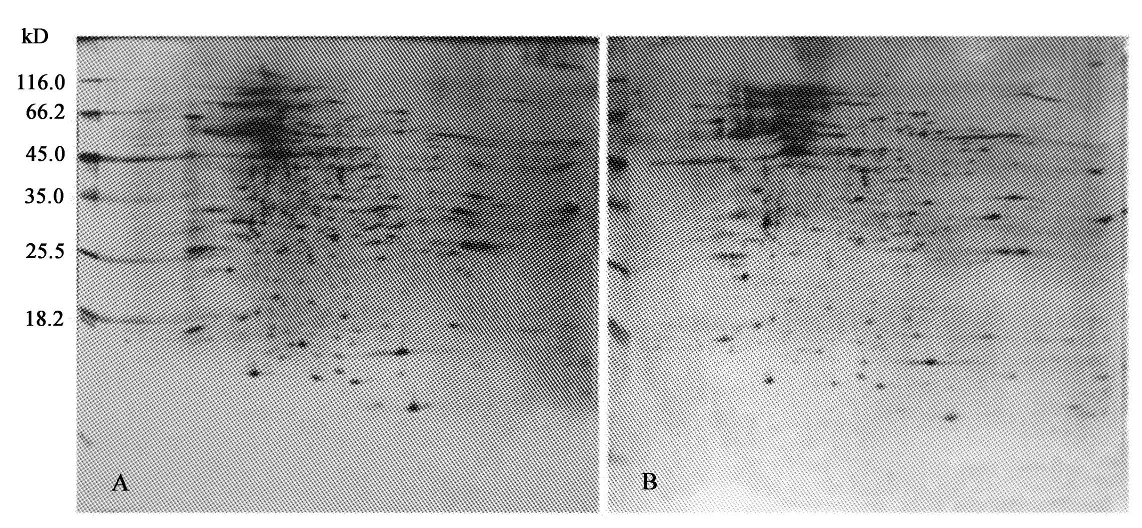


图 1 雄性赤蚁(A)和雌性黑蚁(B)易溶性蛋白的双向电泳图谱

Fig. 1　2D-PAGE patterns of easily dissolvable proteins extracted from newly-hatched male (A) and female (B) larvae of silkworm *Bombyx mori*

使用 Image Master™ 2D platinum 5.0 软件对图中的蛋白点进行匹配分析,雄性赤蚁共检测到 269 个蛋白点,雌性黑蚁检测到 250 个蛋白点。其中雌雄能匹配的点有 225 对,匹配率为 86.71%。特异蛋白点:雄性赤蚁检测到 43 个,雌性黑蚁检测到 25 个。各个特异蛋白点经分析,其等电点和分子量列于表 1 和表 2。在雌雄能匹配的蛋白点中,由于其含量存在差异,经统计分析,将蛋白含量差异达到 3 倍以上的结果列于表 3 和表 4 中。

从表 1 中可见,雄性赤蚁易溶性特异蛋白点的等电点,4.0~5.0 之间有 2 个,5.01~6.0 之间有 24 个,6.01~7.0 之间有 10 个,7.01 以上有 7 个。碱性蛋白占 16.28%,且基本上是弱碱性蛋白,只有两个点的等电点高于 7.5。酸性蛋白占总特异蛋白点的 83.72%。分子量 20 kD 以下的有 9 个,20.01~30 kD间有 11 个,30.01~40 kD 的有 13 个,40.01~50 kD 的有 4 个,50.01~60 kD 的有 3 个,60 kD 以上的有 3 个,有 76.74% 的特异蛋白点分子量在 40 kD 以下。

从表 2 中可见,雌性黑蚁易溶性特异蛋白点的等电点都在 5.0~7.0 之间,均为酸性蛋白。与雄性赤蚁相比,没有特异性的碱性蛋白点。从分子量来看,10~20 kD 的特异点有 2 个,20.01~30 kD 间有 5 个,30.01~40 kD 的有 4 个,40.01~50 kD 的有 8 个,50.01~60 kD 的有 5 个,60 kD 以上的有 1 个。

在 2-DE 图谱能匹配的蛋白点中,雄性赤蚁易溶蛋白点的蛋白含量大于雌性黑蚁 3 倍以上的点共有 23 个。在这 23 个点中,等电点在 4.0~5.0 的有 3 个,5.01~6.0 的有 6 个,6.01~7.0 的有 6 个,7.01~8.0 的有 3 个,8.0 以上的有 5 个。分子量 10~20 kD 的有 4 个,20.01~30 kD 的有 9 个,30.01~40 kD 的有 6 个,40.01~50 kD 之间没有,50~60 kD 的有 4 个。其中雄雌匹配蛋白点 46(雄的双向电泳蛋白点分析编号)与 389(雌的双向电泳蛋白点分析编号)的差异达到 10 倍以上,即存在于雄性赤蚁中的该蛋白含量比雌性黑蚁的要高,其差异量的表达原因是值得深思的问题。

雌性黑蚁大于雄性赤蚁的匹配蛋白点,只有 10 个点相差 3 倍以上。等电点小于 7.0 的有 5 个,在 7.0~8.0 之间的为 4 个,大于 8.0 的有 1 个。分子量集中在 10~30 kD 以及 50~60 kD 之间。

2.2 难溶性蛋白的双向电泳分析

蚁蚕难溶蛋白经双向电泳分析,得到的电泳图

谱如图 2 所示。经 Image Master™ 2D Platinum 5.0 软件分析，雄性赤蚁共检测到 370 个蛋白点，雌性黑蚁检测到 424 个蛋白点，雌性黑蚁的蛋白点数比雄性赤蚁多。雄性赤蚁与雌性黑蚁能匹配的难溶蛋白点共有 318 对，匹配率为 80.10%。其中雄性赤蚁有 52 个特异蛋白点，雌性黑蚁有 106 个特异蛋白点，雌性黑蚁的特异蛋白点比雄性赤蚁多。特异蛋白点的等电点和分子量列于表 5 和表 6。表 7 和表 8 列出了匹配蛋白点的蛋白含量差异大于 3 倍以上的情况。

表 1 限伴雄性赤蚁易溶性蛋白特异点的等电点和分子量

Table 1 Characteristics of molecular weight (MW) and isoelectric point (pI) of specific protein spots in easily dissolvable proteins from newly-hatched male larvae of silkworm *Bombyx mori*

点编号 Spot ID	等电点 pI	分子量(kD) MW	点编号 Spot ID	等电点 pI	分子量(kD) MW	点编号 Spot ID	等电点 pI	分子量(kD) MW
37	6.38	62.57	206	5.59	35.38	308	7.67	26.32
44	7.36	61.54	207	5.35	35.23	312	5.73	26.11
47	6.51	60.53	212	7.15	34.50	322	5.28	24.63
58	6.40	57.10	216	5.34	34.36	327	6.40	23.92
59	6.51	57.34	217	5.72	34.22	331	8.19	23.43
67	6.62	55.46	228	5.80	32.96	349	5.51	19.03
142	5.26	42.67	231	7.06	32.96	367	6.34	16.79
149	5.28	41.61	249	5.62	31.75	373	4.14	16.17
156	5.72	40.59	274	5.47	28.97	376	5.56	15.91
157	5.46	40.25	279	7.17	28.85	377	6.02	15.64
160	5.36	39.92	284	6.01	28.25	379	5.31	15.58
165	5.05	39.26	290	5.36	27.79	388	5.39	14.28
166	6.61	39.26	299	4.16	26.43	390	5.27	14.04
171	5.89	38.77	306	5.26	26.22	418	7.50	9.94
177	5.56	37.81						

表 2 限伴雌性黑蚁易溶性蛋白特异点的等电点和分子量

Table 2 Characteristics of molecular weight (MW) and isoelectric point (pI) of specific protein spots in easily dissolvable proteins from newly-hatched female larvae of silkworm *Bombyx mori*

点编号 Spot ID	等电点 pI	分子量(kD) MW	点编号 Spot ID	等电点 pI	分子量(kD) MW	点编号 Spot ID	等电点 pI	分子量(kD) MW
59	6.77	62.44	166	6.67	48.02	273	6.61	33.05
89	6.66	57.52	180	6.52	46.46	303	6.61	29.71
93	6.70	56.58	194	6.66	44.96	322	6.74	27.82
106	6.15	54.76	197	6.60	43.87	323	6.77	28.05
108	6.69	54.98	207	6.53	42.98	330	6.56	27.03
113	6.20	54.31	228	6.23	38.63	349	5.51	24.70
153	6.62	49.42	229	6.37	38.79	395	5.51	15.66
154	6.67	49.62	239	5.82	37.08	408	5.51	14.48
163	6.52	48.41						

表 3　雄性赤蚁易溶蛋白含量大于雌性黑蚁 3 倍以上的匹配蛋白点

Table 3　The matched protein spots whose abundance in male is over 3-fold compared with that in female in easily dissolvable proteins from newly-hatched larvae of silkworm *Bombyx mori*

匹配组号 Matched group ID	等电点 pI	分子量(kD) MW	倍数(雄赤/雌黑) Fold (male/female)	匹配组号 Matched group ID	等电点 pI	分子量(kD) MW	倍数(雄赤/雌黑) Fold (male/female)
46	4.13	59.87	13.90	288	7.82	27.90	3.86
55	5.27	57.09	6.25	295	8.6	27.22	8.45
71	4.79	54.32	3.36	296	8.3	27.10	4.58
75	5.70	54.54	6.34	313	8.09	25.99	6.14
210	6.12	34.50	3.19	334	8.33	22.76	3.77
211	6.98	34.22	6.57	336	5.25	22.10	4.04
223	8.18	33.65	3.49	338	6.50	21.83	3.09
254	7.28	30.71	4.32	386	5.79	14.76	6.79
258	5.75	30.58	5.77	389	7.32	14.04	17.40
264	6.85	30.20	3.16	406	5.05	12.29	3.30
285	6.34	28.14	4.14	412	6.72	11.69	7.75
286	4.96	28.14	4.46				

表 4　雌性黑蚁易溶蛋白含量大于雄性赤蚁 3 倍以上的匹配蛋白点

Table 4　The matched protein spots whose abundance in female is over 3-fold compared with that in male in easily dissolvable proteins from newly-hatched larvae of silkworm *Bombyx mori*

匹配组号 Matched group ID	等电点 pI	分子量(kD) MW	倍数(雌黑/雄赤) Fold (female/male)	匹配组号 Matched group ID	等电点 pI	分子量(kD) MW	倍数(雌黑/雄赤) Fold (female/male)
51	7.32	58.79	3.53	307	7.39	26.43	4.52
76	6.38	54.77	3.10	332	5.09	22.95	3.50
78	6.83	53.87	3.83	378	4.90	15.64	6.48
95	8.00	50.01	3.23	408	7.31	12.29	4.25
301	6.10	26.77	4.30	425	8.47	12.81	3.62

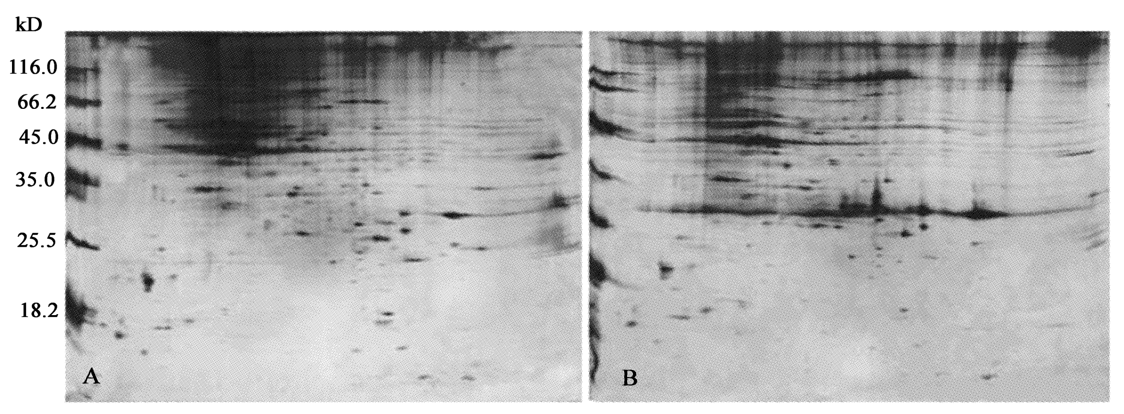


图 2　雄性赤蚁蚕(A)和雌性黑蚁蚕(B)难溶性蛋白质电泳图谱

Fig. 2　2D-PAGE patterns of uneasily dissolvable proteins extracted from newly-hatched male (A) and female (B) larvae of silkworm *Bombyx mori*

表 5 限伴雌性黑蚁难溶性蛋白特异点的等电点和分子量

Table 5 Characteristics of molecular weight (MW) and isoelectric point (pI) of specific protein spots in uneasily dissolvable proteins from newly-hatched female larvae of silkworm *Bombyx mori*

编号 Spot ID	等电点 pI	分子量(kD) MW	点编号 Spot ID	等电点 pI	分子量(kD) MW	点编号 Spot ID	等电点 pI	分子量(kD) MW
209	3.49	86.46	519	5.15	58.08	754	4.06	38.57
214	6.76	84.99	522	4.23	57.91	763	4.28	37.59
219	5.57	85.47	523	4.30	57.91	765	4.21	37.59
236	6.60	84.02	525	5.61	57.75	778	4.21	36.12
241	7.17	83.06	526	4.04	57.75	785	4.93	35.91
251	5.57	82.35	527	4.09	57.75	804	6.61	35.20
255	6.76	81.41	563	5.55	55.64	838	5.07	31.93
257	6.67	82.12	566	6.67	55.64	845	6.32	31.03
261	6.61	80.49	574	5.82	55.32	851	4.69	31.21
273	3.49	80.72	581	6.93	53.76	852	5.73	30.86
279	5.80	80.03	584	4.76	53.61	858	3.40	30.86
280	5.93	79.80	585	4.83	53.61	871	3.57	29.81
281	6.32	80.03	588	4.23	53.15	876	3.38	29.73
282	5.56	80.03	598	4.23	52.10	878	4.17	29.64
288	5.71	79.80	608	3.87	50.63	879	4.35	29.90
289	7.19	78.89	609	4.72	51.50	880	4.51	29.56
291	5.86	79.57	610	4.22	50.48	882	4.01	29.47
293	7.01	79.80	612	3.73	50.48	883	4.59	29.56
295	7.09	79.57	613	4.10	50.48	888	4.90	29.31
298	7.21	78.22	617	3.45	50.19	889	5.02	29.47
300	7.16	79.57	620	5.41	49.76	891	6.76	29.14
317	5.94	78.22	622	5.47	49.76	894	5.15	29.31
324	3.41	77.77	651	5.23	47.95	896	6.50	29.22
332	5.56	77.33	657	5.09	48.08	913	5.91	27.68
335	5.77	76.67	661	6.10	47.40	916	6.07	27.52
338	6.08	76.89	665	5.50	46.86	923	4.78	26.74
359	3.49	75.36	667	3.36	46.59	952	6.69	24.82
365	7.01	74.72	671	3.46	46.46	953	6.78	24.49
367	7.09	74.50	690	4.72	45.41	1 032	4.72	20.34
372	4.10	74.29	694	4.51	45.15	1 035	4.72	20.08
375	5.77	74.50	712	5.98	43.38	1 070	6.27	17.14
379	7.19	73.87	721	4.73	43.13	1 079	6.91	16.57
430	5.64	68.37	731	5.98	42.15	1 082	6.93	16.54
442	5.43	66.82	744	5.35	40.73	1 382	6.83	49.62
502	3.83	59.60	750	4.21	38.79	1 384	4.23	60.98
511	6.42	58.92						

表 6 限伴雄性赤蚁难溶性蛋白特异点的等电点和分子量

Table 6 Characteristics of molecular weight (MW) and isoelectric point (pI) of specific protein spots in uneasily dissolvable proteins from newly-hatched male larvae of silkworm *Bombyx mori*

点编号 Spot ID	等电点 pI	分子量(kD) MW	点编号 Spot ID	等电点 pI	分子量(kD) MW	点编号 Spot ID	等电点 pI	分子量(kD) MW
94	6.42	92.54	331	5.50	62.25	513	4.89	45.60
138	7.54	87.10	343	3.96	59.40	521	5.13	45.23
144	6.52	84.73	345	5.15	59.40	593	6.72	37.40
145	6.58	84.97	368	6.15	57.95	654	5.14	32.50
165	8.21	84.27	377	5.96	56.37	698	4.50	29.19
182	6.57	81.31	381	5.40	55.91	699	4.79	29.11
186	6.52	81.08	414	5.97	53.94	710	6.44	27.70
187	5.58	80.64	415	7.20	53.35	737	7.08	24.54
194	4.19	79.97	424	3.30	51.76	739	6.72	24.68
205	6.52	78.45	430	4.18	50.77	741	8.20	24.45
262	3.86	70.65	433	3.95	51.05	757	7.70	23.70
271	5.63	68.92	442	7.22	50.49	819	6.69	18.05
273	5.58	67.98	452	3.32	49.94	821	4.73	17.91
276	5.48	67.42	461	6.23	49.8	825	4.74	17.53
281	5.90	68.17	474	3.35	48.45	834	6.90	16.76
296	3.95	67.24	478	3.29	48.45	842	7.08	16.25
329	3.88	62.25	485	4.92	47.79	1 169	7.97	24.45
330	3.98	62.08						

从表 5 中可见，雌性黑蚁难溶蛋白特异点的等电点，4.0 以下的有 13 个，4.01 ~ 5.0 之间有 32 个，5.01 ~ 6.0 之间有 30 个，6.01 ~ 7.0 之间有 22 个，7.0 以上 9 个。酸性蛋白占总特异蛋白点数的 93.40%。分子量在 10 ~ 20 kD 的特异点有 3 个，20.01 ~ 30 kD 间有 19 个，30.01 ~ 40 kD 的有 12 个，40.01 ~ 50 kD 的有 15 个，50.01 ~ 60 kD 的有 22 个，60.01 ~ 70 kD 之间的有 3 个，70.01 ~ 80 kD 之间的有 19 个，80 kD 以上的有 12 个。分子量在 60 kD 以上的占总特异蛋白点数的 32.08%。

从表 6 中可见，雄性赤蚁难溶蛋白特异点的等电点，4.0 以下的有 10 个，4.01 ~ 5.0 之间有 8 个，5.01 ~ 6.0 之间有 12 个，6.01 ~ 7.0 之间有 13 个，7.0 以上有 9 个。酸性蛋白占总特异蛋白点数的 86.54%。分子量在 10 ~ 20 kD 的特异点有 5 个，20.01 ~ 30 kD 间有 8 个，30.01 ~ 40 kD 的有 2 个，40.01 ~ 50 kD 的有 7 个，50.01 ~ 60 kD 的有 11 个，60.01 ~ 70 kD 之间的有 8 个，70.01 ~ 80 kD 之间的有 3 个，80 kD 以上的有 8 个。分子量在 60 kD 以上的占总特异蛋白点数的 36.54%。

雌性黑蚁难溶蛋白 2-DE 图谱中蛋白含量大于雄性赤蚁难溶蛋白 3 倍的点共有 53 个，分布在等电点 3.5 ~ 8.5 之间，其中 4.0 以下的有 3 个，4.01 ~ 5.0 的有 7 个，5.01 ~ 6.0 的有 12 个，6.01 ~ 7.0 的有 17 个，7.01 ~ 8.0 的有 11 个，8.0 以上的有 3 个。分子量 20 kD 以下的有 3 个，20.01 ~ 30 kD 的有 13 个，30.01 ~ 40 kD 的有 14 个，40.01 ~ 50 kD 的有 5 个，50.01 ~ 60 kD 的有 5 个，60.01 ~ 70 kD 的有 5 个，70.01 ~ 80 kD 的有 5 个，80 kD 以上的有 4 个。

雄性赤蚁难溶蛋白 2-DE 图谱中蛋白含量大于雌性黑蚁难溶蛋白 3 倍的点共有 52 个，其中等电点在 4.0 以下的有 7 个，4.01 ~ 5.0 的有 8 个，5.01 ~ 6.0 的有 11 个，6.01 ~ 7.0 的有 13 个，7.01 ~ 8.0 的有 9 个，8.0 以上的有 4 个。分子量 20 kD 以下的有 6 个，20.01 ~ 30 kD 的有 8 个，30.01 ~ 40 kD 的有 9 个，40.01 ~ 50 kD 的有 12 个，50.01kD ~ 60 kD 的有 7 个，60.01 ~ 70 kD 的有 5 个，70.01 ~ 80 kD 的有 3 个，80 kD 以上的有 2 个。

表 7　雌性黑蚁难溶蛋白含量大于雄性赤蚁 3 倍以上的匹配蛋白点

Table 7　The matched protein spots whose abundance in female is over 3-fold compared with that in male in uneasily dissolvable proteins from newly-hatched larvae of silkworm *Bombyx mori*

匹配组号 Matched group ID	等电点 pI	分子量(kD) MW	倍数(雌黑/雄赤) Fold (female/male)	匹配组号 Matched group ID	等电点 pI	分子量(kD) MW	倍数(雌黑/雄赤) Fold (female/male)
98	6.24	92.29	4.58	641	5.21	33.65	21.16
152	6.14	84.04	4.59	653	5.98	32.53	23.87
189	7.12	80.86	18.00	663	6.55	31.84	15.23
190	7.23	80.64	3.35	666	6.86	31.58	29.82
193	3.94	79.75	10.70	667	7.51	31.64	13.96
204	6.42	78.45	5.49	675	5.86	31.21	79.37
213	7.12	78.02	26.40	680	6.21	30.27	12.72
227	6.52	76.32	3.07	683	5.73	30.27	16.36
264	6.34	70.85	3.95	685	6.51	29.88	10.44
285	6.52	68.17	5.01	686	5.33	29.87	10.26
295	8.16	67.61	3.32	692	5.82	29.65	12.43
306	6.42	65.59	3.74	693	6.99	29.45	3.64
339	6.38	60.39	7.95	695	7.20	29.57	4.28
388	7.43	56.22	3.33	696	4.65	29.21	16.17
392	6.32	56.37	7.55	713	4.45	27.45	8.63
420	7.79	52.77	30.50	715	5.09	27.27	4.41
422	8.16	52.33	7.55	717	5.61	27.12	4.30
449	7.01	50.22	5.32	732	6.55	25.44	8.11
500	7.29	46.62	4.40	786	6.65	21.97	5.80
508	4.20	45.73	5.41	798	7.94	21.00	6.48
541	4.94	42.69	10.40	815	3.79	18.82	39.11
556	4.81	41.41	3.23	844	8.00	16.29	4.53
580	3.87	37.71	8.38	1 165	5.63	18.05	5.00
581	5.13	38.13	11.40	1 168	7.55	25.43	6.30
606	4.87	36.09	17.40	1 172	4.47	33.33	7.56
610	5.21	35.69	11.10	1 174	6.87	64.70	5.88
629	5.38	34.32	45.85				

2.3 雄性赤蚁难溶蛋白特异点的质谱分析

在难溶蛋白中，通过比对分析，发现一个较为明显的蛋白点 741 号(双向电泳蛋白点分析编号)只在雄性赤蚁中出现，雌性黑蚁则没有此相应的蛋白点，且位置相对独立，没有杂蛋白的干扰。为了对该特异性蛋白作进一步分析，将其切取做 LC-TOF-TOF 质谱分析，蛋白点的位置如图 3 所示，总离子流质谱图见图 4。

质谱分析得到的肽片段为：R. TLLESVESR. L，分子量为 24.45 kD，等电点 8.20。通过 NCBI 搜索匹配，与已知的象鼻虫的一种生长促进蛋白有 11 个氨基酸匹配，匹配率只有 2.04%。已知象鼻虫生长促进蛋白的分子量为 49.47 kD；等电点为 6.68。因而，本分析的雄蚁难溶性特异蛋白，是否是一种新的生长促进蛋白有待更深入的分析才能确定。

表 8　雄性赤蚁难溶蛋白含量大于黑蚁 3 倍以上的匹配蛋白点

Table 8　The matched protein spots whose abundance in male is over 3-fold compared with that in female in uneasily dissolvable proteins from newly-hatched larvae of silkworm *Bombyx mori*

匹配组号 Matched group ID	等电点 pI	分子量(kD) MW	倍数(雄赤/雌黑) Fold (male/female)	匹配组号 Matched group ID	等电点 pI	分子量(kD) MW	倍数(雄赤/雌黑) Fold (male/female)
141	7.53	85.20	3.57	523	7.15	45.10	3.10
158	6.04	83.81	6.18	528	6.56	43.16	7.18
225	5.81	76.11	4.02	547	5.4	42.10	9.67
257	6.53	70.85	8.97	571	6.72	38.66	11.50
258	6.72	71.04	10.70	586	4.51	37.50	9.50
272	6.20	68.36	3.71	588	8.19	37.81	19.10
282	6.04	68.17	5.14	594	5.67	36.28	3.53
311	7.53	63.46	4.25	604	5.36	36.09	8.69
313	4.16	62.59	4.01	616	4.64	35.10	3.98
328	3.77	62.25	4.96	647	4.73	33.13	3.57
351	5.29	59.07	8.5	668	7.86	31.18	9.72
352	5.63	59.24	5.55	714	5.82	27.25	6.88
362	8.14	59.24	3.01	722	6.92	26.36	3.33
425	5.17	50.35	36.9	748	6.63	23.98	3.17
437	7.47	50.91	4.32	766	7.36	23.01	5.15
447	6.66	50.08	7.22	768	7.25	23.01	8.11
456	6.52	49.94	11.30	769	6.25	22.70	5.30
458	5.54	50.49	3.49	789	3.61	21.38	5.84
469	4.21	48.99	3.06	797	3.66	20.72	7.17
472	8.94	47.52	9.90	806	3.65	19.81	4.22
481	9.10	47.92	11.70	831	3.27	16.86	3.03
502	4.73	45.73	6.18	832	3.94	16.93	3.61
504	4.65	45.73	5.67	835	6.98	16.79	5.48
505	7.51	46.23	3.34	847	3.24	15.66	3.55
514	5.87	45.35	5.04	876	7.44	12.64	4.56
516	5.06	45.23	6.55	1 171	4.48	34.82	6.09

3　讨论

限伴品种雄蚕为赤蚁，雌蚕为黑蚁，在胚胎发育的过程中，赤蚁胚胎对高温干燥的环境条件敏感，而黑蚁胚胎则不敏感。为探索其差异的生理原因，本文以刚孵出的雌雄蚁蚕为材料，利用双向电泳技术，对蚁体的蛋白组分进行比较分析。结果表明，雌雄间不论是在易溶蛋白还是难溶蛋白的组分中，均存在一定的差异。在易溶蛋白中，雄蚁和雌蚁分别检测到 269 和 250 个蛋白点，性质相同能相互匹配的蛋白点占 86.71%，特异蛋白雄蚁有 43 个，雌蚁有 25 个；在难溶蛋白中，雄蚁和雌蚁分别检测到 370 和 427 个蛋白点，能互相匹配的占 80.10%，雄、雌蚁的特异蛋白分别为 52 个和 106 个。

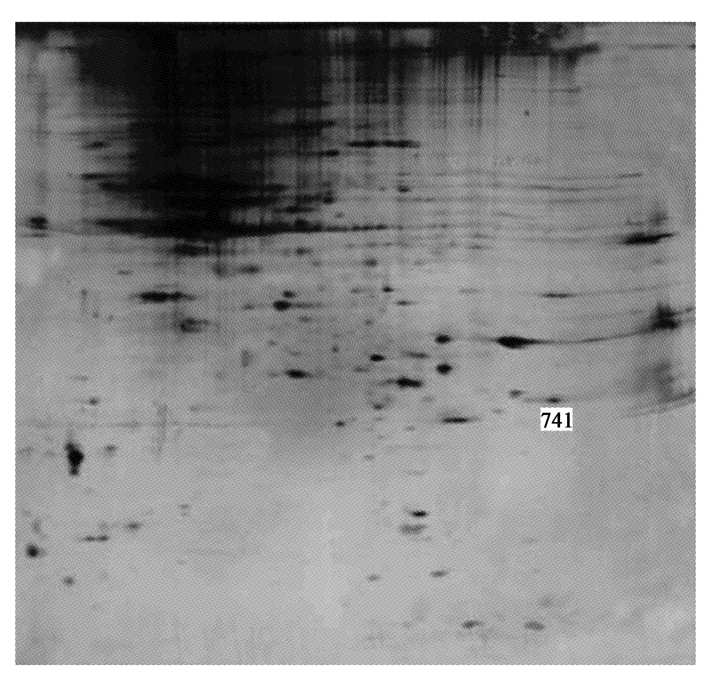


图 3　质谱分析的雄性赤蚁蛋白斑点 741 在图谱中的位置

Fig. 3　The protein spot (No. 741) which was excised from the gel and subjected to mass spectrometry

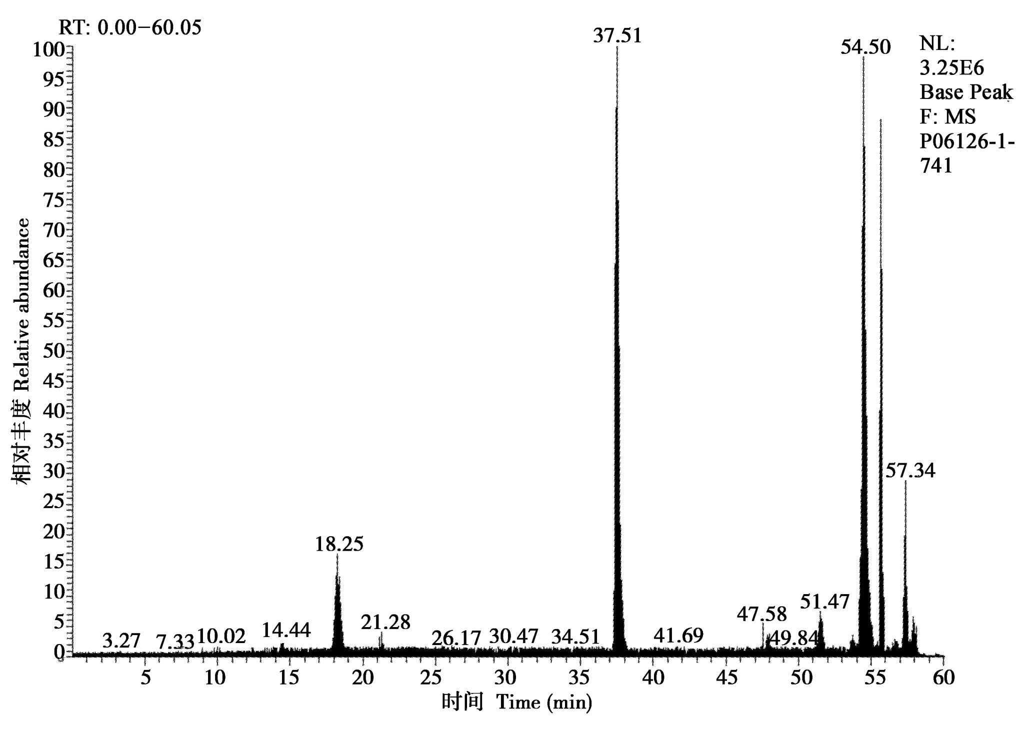


图 4　差异蛋白点的总离子流质谱图

Fig. 4 The total ion-current mass spectrometric map of the protein spot No. 741

在雌雄共有能相互匹配的蛋白点中，蛋白含量雄蚁高于雌蚁 3 倍以上的蛋白点有 170 个，雌蚁中的表达量高于雄蚁 3 倍以上的蛋白斑点有 194 个。这种在含量上有差异表达的蛋白，大部分是属于偏酸性的小分子量蛋白，等电点小于 7，分子量在 40 kD 以内。这种现象表明，雌雄蚕在胚胎的生长发育中，构成蚁体的蛋白组分，有明显的差异。其中一些可能是雌雄性别生理构成上的差别，另有一些可能是与雌雄抗逆性有关的差异蛋白，若能从中查找出与高温干燥敏感性相关的蛋白，将有助于进一步研究温敏基因的表达调控机制。

Gamo(1978)经对蚕的蛋白研究后认为，家蚕

30 kD 蛋白为一类脂蛋白，在蚕的生长发育中是一种功能性的储藏蛋白。从本实验的蚁蚕难溶蛋白的双向图谱中，我们也观察到在分子量约为 30 kD 处的蛋白点，雌蚁的蛋白点比雄蚁的多，相对蛋白含量也明显高，是否 30 kD 蛋白对雌胚胎的发育更为重要是值得进一步比较分析的问题。Tojo 等(1980)认为 30 kD 蛋白可能作为胚胎发育的营养来源，钟伯雄(1999)的检测表明卵中 30 kD 蛋白占整个卵黄蛋白的35%，可能对家蚕胚胎的发育具有重要的功能作用。Zhong 等(2005)利用温敏性品种，研究分析 30 kD 蛋白与胚胎发育的关系，认为 30 kD 蛋白的正常代谢变化是胚胎发育的先决条件。30 kD 蛋白与家蚕生长发育的关系紧密，是一类重要储藏蛋白。本研究的限伴品种，雌性黑蚁比雄性赤蚁能耐受高温干燥的催青条件，可能由于胚胎在生长发育的过程中，当遇到高温干燥条件时，雌性胚胎因其有较多的 30 kD 储藏蛋白能及时为其快速提供能量，所以比雄性耐受高温干燥，这一推测是否成立，还需要其他的实验来旁证。根据已有的研究表明，家蚕 30 kD 蛋白可以结合葡萄糖和葡聚糖，具有载脂蛋白功能，并且可参与到家蚕的自我防御体系中(Ujita *et al.*, 2005)，血淋巴中 30 kD 蛋白能抑制昆虫血细胞的凋亡(Kim *et al.*, 2001, 2003)，30 kD 蛋白有助于延长细胞以及其幼虫存活的作用(唐平等，2007)。因此，也有可能是 30 kD 蛋白使得防御能力加强，从而增强了黑蚁胚胎对高温干燥的耐受能力。

在难溶蛋白中，只在雄性赤蚁中特异表达的 741 号(双向电泳蛋白点分析编号)蛋白点，经质谱分析，其肽序列与象鼻虫的一种生长促进蛋白有 2.04% 匹配率，它是否属于生长促进蛋白，或是一种新类型蛋白因分析条件的限制还没能证实，有待以后的研究来判明。

参 考 文 献 (References)

Gamo T, 1978. Low molecular weight lipoproteins in the haemolymph of the silkworm *Bombyx mori*: Inheritance, isolation and some properties. *Insect Biochemistry*, 8: 457 – 470.

Huang JT, 1980. Studies on sex control in the silkworm (*Bombyx mori*). *Hereditas*, 2(2): 1 – 5. [黄君霆, 1980. 家蚕性别控制的研究. 遗传, 2(20): 1 – 5]

Kim EJ, Park HJ, Park TH, 2003. Inhibition of apoptosis by recombinant 30K protein originating from silkworm hemolymph. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 308(3): 523 – 528.

Kim EJ, Rhee WJ, Park TH, 2001. Isolation and characterization of an apoptosis-inhibiting component from the hemolymph of *Bombyx mori*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 285: 224 – 228.

Li JY, Lin JR, Liao FP, Li WC, Zhong SQ, 2003. Relationship between the temperature, humidity in incubating condition and the activity of resist-oxidation enzyme in silkworm embryonic development. *Hubei Agricultural Sciences*, (1): 62 – 73. [李金玉, 林健荣, 廖富萍, 李文楚, 钟生泉, 2003. 催青温湿度与家蚕胚胎发育中抗氧化酶活力的关系. 湖北农业科学, (1): 62 – 73]

Lin JR, Chen JX, Deng XJ, Huang ZL, Huang ZR, 2001. Biochemical analysis of temperature-sensitive silkworm eggs under high temperature and low humidity incubation condition. *Acta Sericologica Sinica*, 27(1): 16 – 19. [林健荣, 陈建勋, 邓小娟, 黄卓烈, 黄自然, 2001. 高温干燥催青条件对温敏性蚕品种胚胎发育生理生化影响的探讨. 蚕业科学, 27(1): 16 – 19]

Lin JR, Zhong SQ, Huang ZR, Zhang XW, Huang XG, 1997. Expression analysis of sex-linked temperature sensitive gene, silkworm (*Bombyx mori*). *Guangdong Sericulture*, 31(4): 17 – 20. [林健荣, 钟生泉, 黄自然, 张学武, 黄星光, 1997. 家蚕伴性温敏基因表达的分析. 广东蚕业, 31(4): 17 – 20]

Lin JR, Zhong SQ, Yan HC, Deng XJ, Huang XG, 1999. Controlling breeding of male or female silkworm (*Bombyx mori*) by using the temperature-sensitive character. *Guangxi Sericulture*, 36(2): 1 – 5. [林健荣, 钟生泉, 严会超, 邓小娟, 黄星光, 1999. 利用蚕胚胎期的温敏性控制雌性或雄性蚕的孵化. 广西蚕业, 36(2): 1 – 5]

Pan QZ, Chen YL, Chen JW, Lin JR, Huang ZR, 1992. Sex control of silkworm, *Bombyx mori* by using sensitive character to incubating temperature and humidity. *Chinese Science Bulletin*, 37(12): 1 133 – 1 136. [潘庆中, 陈业林, 陈劲伟, 林健荣, 黄自然, 1992. 利用催青温湿度敏感性状控制家蚕性别. 科学通报, 37(12): 1 133 – 1 136]

Tang P, Li B, Shen WD, Chen JP, Wang WB, 2007. Influence of 30 KD protein in *Bombyx mori* on survival BmN cells and larvae. *Chinese Bulletin of Entomology*, 44(6): 826 – 829. [唐平, 李兵, 沈卫德, 陈劲频, 王文兵, 2007. 30K 蛋白对家蚕细胞及幼虫存活的作用. 昆虫知识, 44(6): 826 – 829]

Tojo S, Negata M, Kobayashi M, 1980. Storage protein in the silkworm, *Bombyx mori*. *Insect Biochemistry*, 10: 289 – 303.

Ujita M, Katsuno Y, Kawachi I, Ueno Y, Banno Y, Fujii H, Hara A, 2005. Glucan-binding activity of silkworm 30-kDa apolipoprotein and its involvement in defense against fungal infection. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, 69: 1 178 – 1 185.

Xia JG, Tang WY, 1980. The relationship between sex and economic character of silkworm *Bombyx mori*. *Acta Sericologica Sinica*, 6(3): 167 – 172. [夏建国, 唐文月, 1980. 家蚕性别与经济性状的关系. 蚕业科学, 6(3): 167 – 172]

Xiang MH, Zhuang DH, He JL, Chen GH, Zhao XX, 1982. Study on several physiological indexes of silkworm (*Bombyx mori*). *Acta Sericologica Sinica*, 8(1): 20 – 25. [项美华, 庄大桓, 何家禄, 陈国瑚, 赵小萱, 1982. 雌雄蚕若干生理特性的研究. 蚕业科

学, 8(1): 20 - 25]

Yao YT, Zhu XR, Zhao LH, He KR, Li YF, Liu XJ, He XL, Wang YQ, 2007. The comparative test of combinations hybridized female silkworm parthenogenetic clones with balanced lethal male silkworm. *Bulletin of Sericulture*, 38(4): 9 - 12. [姚耀涛, 祝新荣, 赵丽华, 何克荣, 李玉峰, 柳新菊, 何秀玲, 王永强, 2007. 家蚕雌蚕无性克隆系与平衡致死雄蚕杂交组合比较试验. 蚕桑通报, 38(4): 9 - 12]

Zhong BX, 1999. Characterization and stage-specific change of proteins during the embryonic development of silkworm *Bombyx mori*. *Acta Genetica Sinica*, 26(6): 627 - 633. [钟伯雄, 1999, 家蚕胚胎发育时期的蛋白质及构造分析. 遗传学报, 26(6): 627 - 633]

Zhong BX, Li YK, Lin JR, Liang JS, Su SK, Xu HS, Yan HY, Zhang PB, Fujii H, 2005. Possible effect of 30K proteins in embryonic development of silkworm *Bombyx mori*. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, 37(5): 355 - 361.

Zhong BX, Yan HY, Shen FY, Li JK, Zhou L, 2003. Preparation of silkworm protein using two dimensional polyacryamide gel electrophoresis. *Acta Sericologica Sinica*, 29(4): 427 - 432. [钟伯雄, 颜海燕, 沈飞英, 李建科, 周丽, 2003. 家蚕蛋白质双向电泳的样品制备方法. 蚕业科学, 29(4): 427 - 432]

(责任编辑:邓艳)